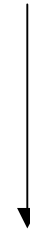


Colorazioni istologiche
Immunoistochimica
Immunofluorescenza
Immunogold



Tecniche che richiedono la
fissazione del preparato
(cellule o sezioni di
tessuto)
= materiale morto

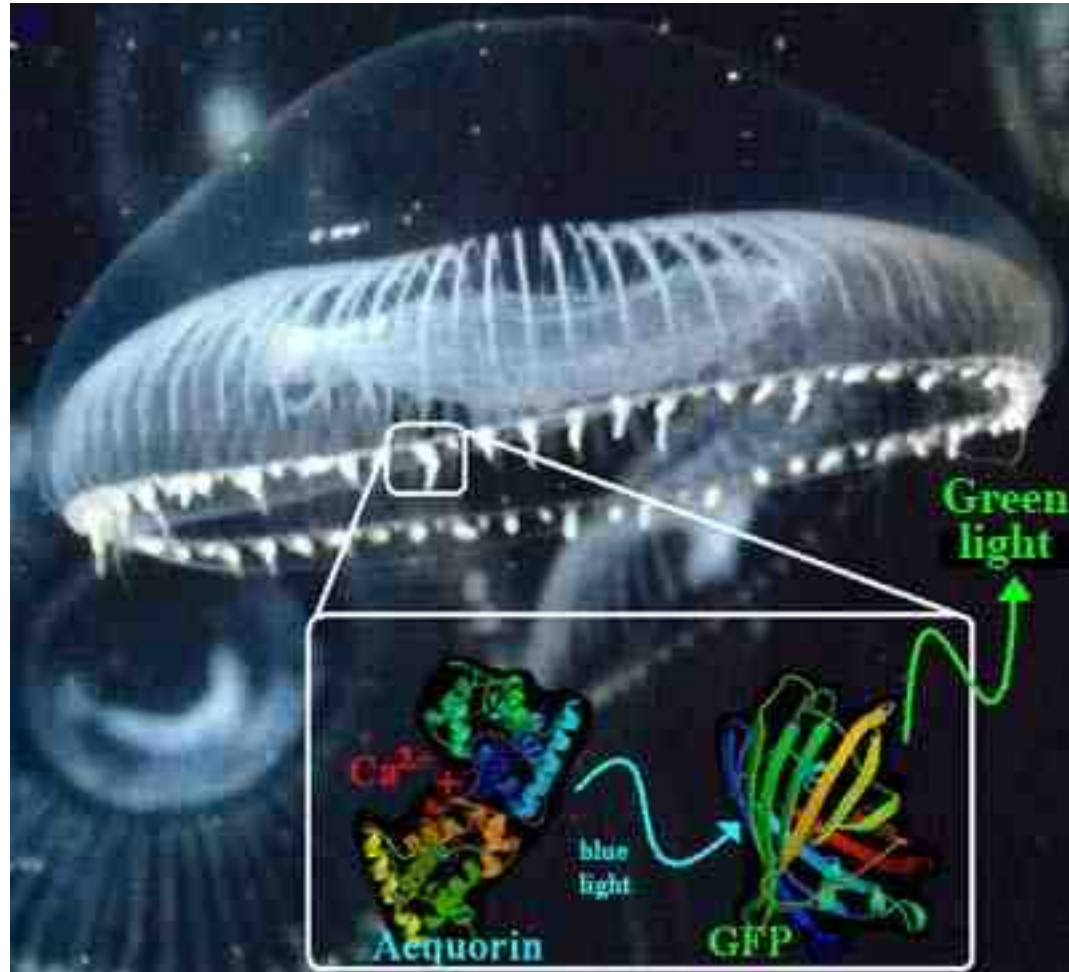
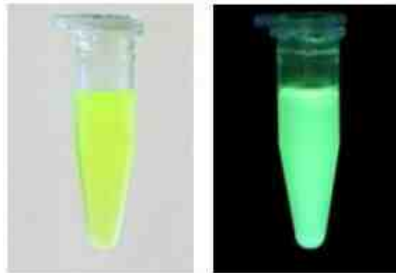
GFP



Tecniche che non
richiedono
compatibili con
cellule o tessuti
vivi

Green Fluorescent Protein

GFP



DNA

.....bcdhetheyjrjrujurukhndgbxvdhjydgndjeygbxgbrertrwvbgd
ghdytbsqatbsgzfdvzblactinaèunaproteinadiformaglobularess
tavfvcvxeognisingolasubunitàxvsarazczfbdiactinasipuòlegar
eadaltreduesubunitàformandocosìgetgwrdivzvunpolimerolin
earelapiùaltapresenzadiactinasiverificanellecelluledeltessut
omuscolaredoveèfondamentaleperilprocessodicontrazioneh
etsfbsgndfk8ietqefbmlui6y5tafx.....

DNA

.....bcdhetheyjrjrujurukhndgbxvdhjydgndjeygbxgbrertrwvbgd
ghdytbs[qatbsgzfdvzblactinaèunaproteinadiformaglobularess
tavfvcvxeognisingolasubunitàxvsarazczfbdiactinasipuòlegar
eadaltreduesubunitàformandocosìgetgwrdrvzvunpolimerolin
earelapiùaltapresenzadiactinasiverificanellecelluledeltessut
omuscolaredoveèfondamentaleperilprocessodicontrazioneh
etsfbsgndfk8ietqefbm]lui6y5tafx.....



DNA

.....bcdhetheyjrjrujurukhndgbxvdhgydgndjeygbxgbrertrwvbgd
ghdytbsqatbsgzfdvzblactinaèunaproteinadiformaglobularaess
tavfvcvxeognisingolasubunitàxvsarazczfbdiactinasipuòlegar
eadaltreduesubunitàformandocosìgetgwrdrvzvunpolimerolin
earelapiùaltapresenzadiactinasiverificanellecelluledeltessut
omuscolaredoveèfondamentaleperilprocessodicontrazioneh
etsfbsgndfk8ietqefbm]ui6y5tafx.....



Trascrizione

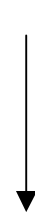
mRNA primario

qatbsgzfdvzblactinaèunaproteinadiformaglobularaessstavfvcv
xeognisingolasubunitàxvsarazczfbdiactinasipuòlegareadaltr
eduesubunitàformandocosìgetgwrdrvzvunpolimerolinearela
piùaltapresenzadiactinasiverificanellecelluledeltessutomusc
olaredoveèfondamentaleperilprocessodicontrazionehetsfbs
gndfk8ietqefbm

mRNA primario

qatbsgzfdvzblactina è una proteina di forma globulare. È stata trovata in
xeognisingola subunità. È un sarcofago di actina. Si può legare ad altre
due subunità formando un dimero. È un polimero lineare. È la
più alta presenza di actina si verifica nelle cellule del tessuto musco-
lare dove è fondamentale per il processo di contrazione. È un
gndfk8ietqefbm

mRNA maturo



Modifiche post-trascrizionali

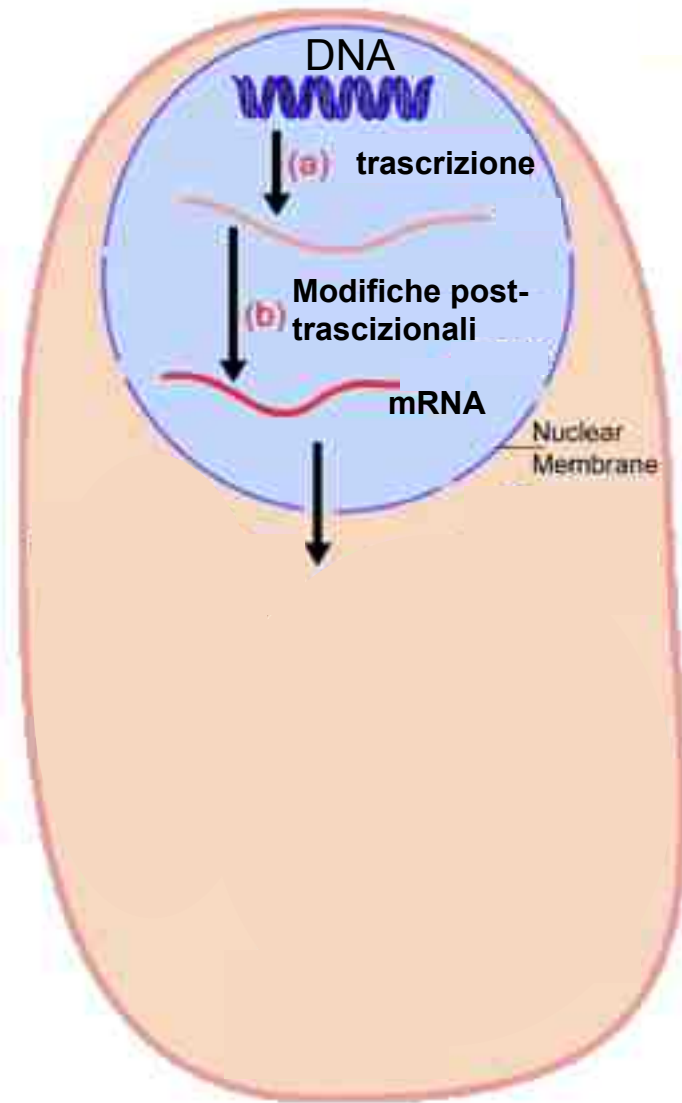
mRNA primario

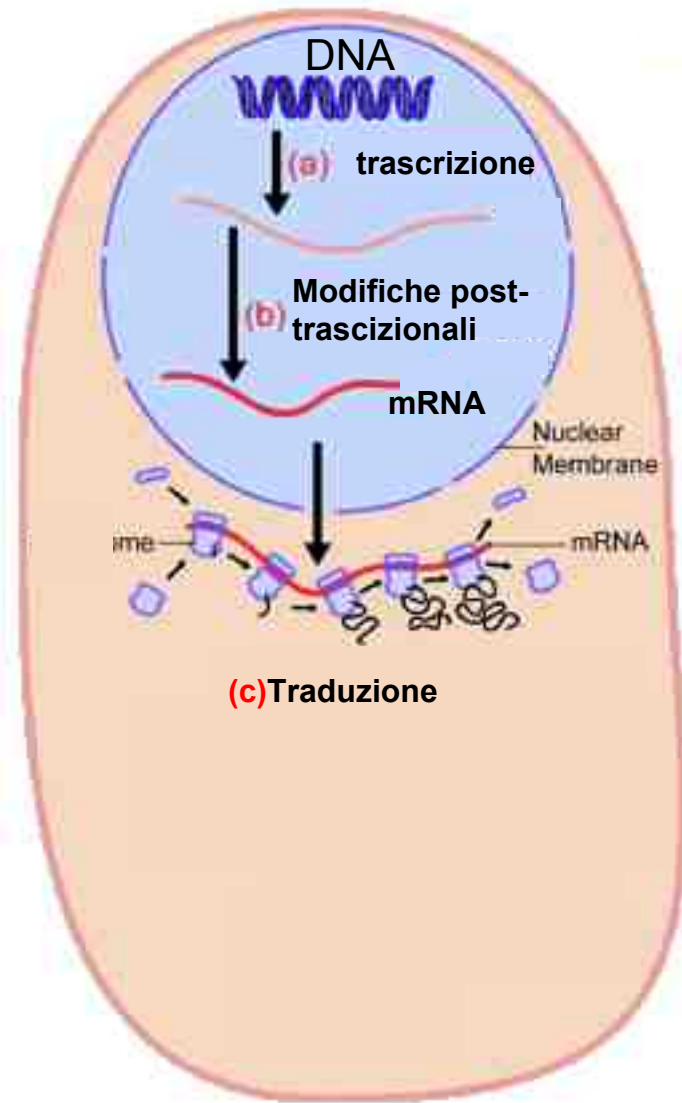
qatbsgzfdvzblactina è una proteina di forma globulare sstavfvcv
xeognisingolasubunitàxvsarazczfbdiactinasipuòlegareadaltre
duesubunitàformandocosiègetgwrdivzvnopolimerolinearela
piùaltapresenzadiactinasiverificanellecelluledeltessutomusc
olaredoveèfondamentaleperilprocessodicontrazionehetsfbs
gndfk8ietqefbm

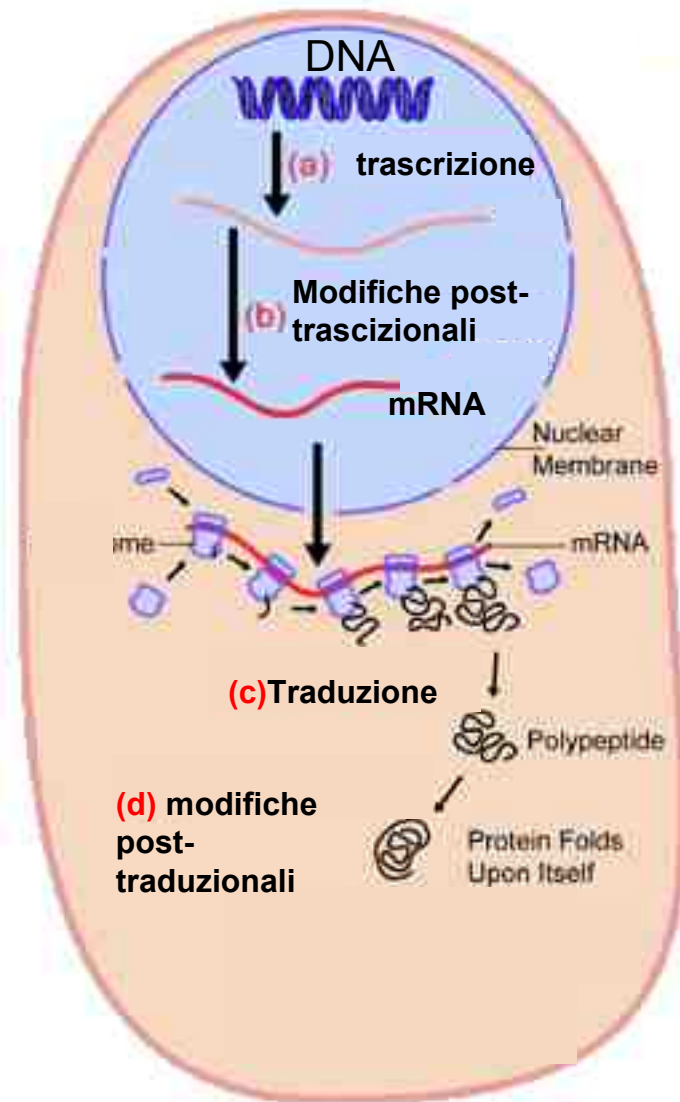
mRNA maturo

↓
Modifiche post-trascrizionali
Splicing + CAP e poliA

CAP qatbsgzfdvzblactina è una proteina di forma globulare ogni
singola subunità di actina si può legare ad altre due subunità form
andocosi è un polimer lineare la più alta presenza di actina si verifi
cane nelle cellule del tessuto muscolare dove è fondamentale per il
processo di contrazione hetsfbsgndfk8ietqefbmAAAAAAAAA







DNA

.....bcdhetheyjrjrujurukhndgbxvdhjydgndjeygbxgbrertrwvbgd
ghdytbsqatbsgzfdvzblactinaèunaproteinadiformaglobularess
tavfvcvxeognisingolasubunitàxvsarazczfbdiactinasipuòlegar
eadaltreduesubunitàformandocosìgetgwrdrvzvunpolimerolin
earelapiùaltapresenzadiactinasiverificanellecelluledeltessut
omuscolaredoveèfondamentaleperilprocessodicontrazioneec
codiceperlagfp hetsfbsgndfk8ietqefbmlui6y5tafx.....

DNA

.....bcdhetheyjrjrujukhndgbxvdhgydgndjeygbxgbrertrwvbgd
ghdytbsqatbsgzfdvzblactinaèunaproteinadiformaglobularaess
tavfvcvxeognisingolasubunitàxvsarazczfbdiactinasipuòlegar
eadaltreduesubunitàformandocosìgetgwrdrvzvunpolimerolin
earelapiùaltapresenzadiactinasiverificanellecelluledeltessut
omuscolaredoveèfondamentaleperilprocessodicontrazione**c**
odiceperlagfphetsfbsgndfk8ietqefbm]ui6y5tafx.....



Trascrizione

mRNA primario

qatbsgzfdvzblactinaèunaproteinadiformaglobularaessstavfvcv
xeognisingolasubunitàxvsarazczfbdiactinasipuòlegareadaltr
eduesubunitàformandocosìgetgwrdrvzvunpolimerolinearela
piùaltapresenzadiactinasiverificanellecelluledeltessutomusc
olaredoveèfondamentaleperilprocessodicontrazione**codicep**
erlagfphetsfbsgndfk8ietqefbm

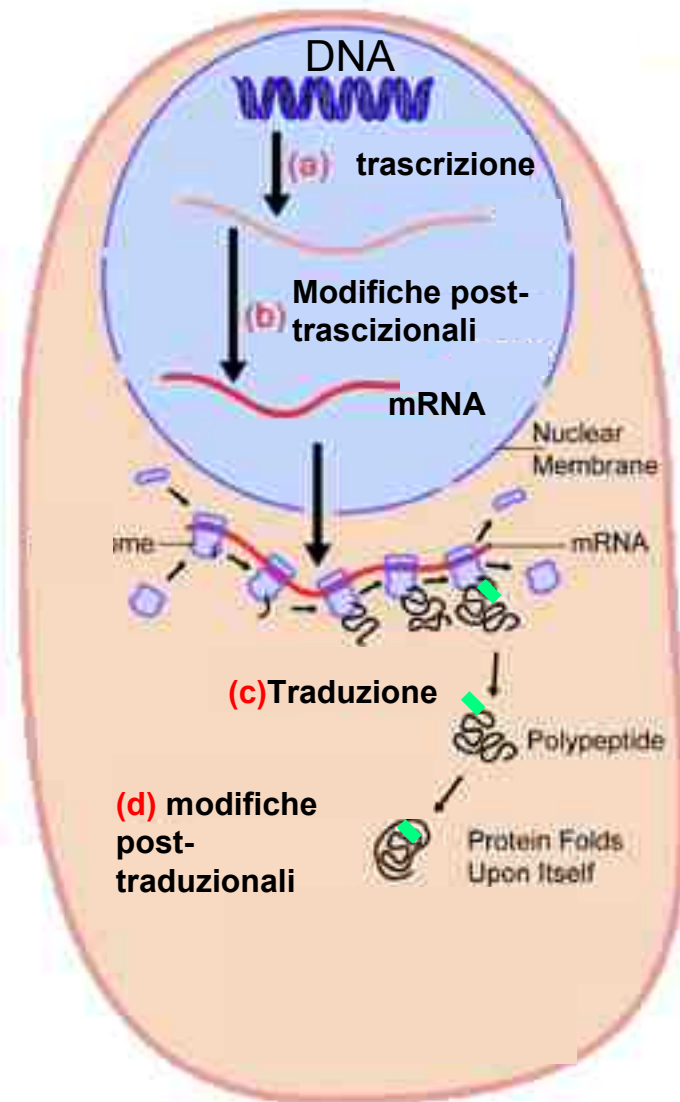
mRNA primario

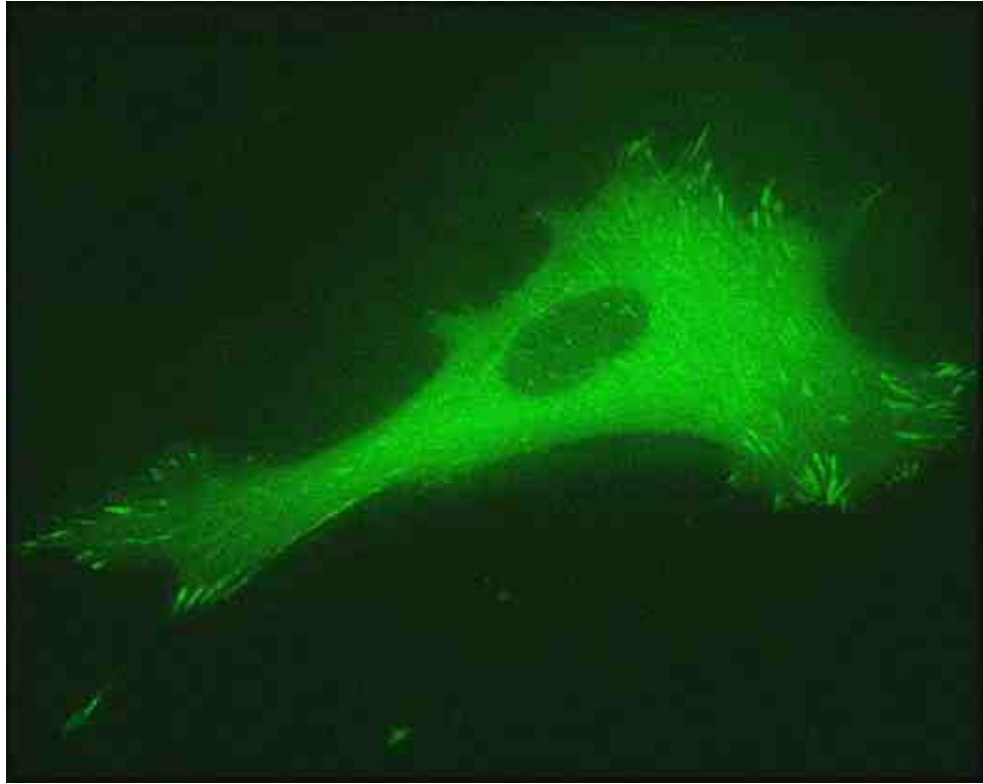
qatbsgzfdvzblactinaèunaproteinadiformaglobularesstavfvcv
xeognisingolasubunitàxvsarazczfbdiactinasipuòlegareadaltr
eduesubunitàformandocosìgetgwrdivzvunpolimerolinearela
piùaltapresenzadiactinasiverificanellecelluledeltessutomusc
olaredoveèfondamentaleperilprocessodicontrazione**codicep**
erlagfphetsfbsgndfk8ietqefbm

mRNAmaturo

↓
Modifiche post-trascrizionali
Splicing + CAP e poliA

CAPqatbsgzfdvzblactinaèunaproteinadiformaglobulareogni
singolasubunitàdiactinasipuòlegareadaltrduesubunitàform
andocosìunpolimerolinearelappiùaltapresenzadiactinasiverifi
canellecelluledeltessutomuscolaredoveèfondamentaleperil
processodicontrazione**codiceperlagfp**hetsfbsgndfk8ietqefb
mAAAAAAAAAA





Time-lapse: video microscopia di cellule in coltura al microscopio rovesciato a fluorescenza

Esempio:

Time lapse della proteina di fusione GFP-caderina in cellule epiteliali in coltura.

Notare la localizzazione diffusa della fluorescenza nella cellula isolata: la proteina di fusione è localizzata sulla membrana plasmatica.

Osservare la redistribuzione della proteina di fusione e la sua concentrazione nei punti di interazione tra le cellule.

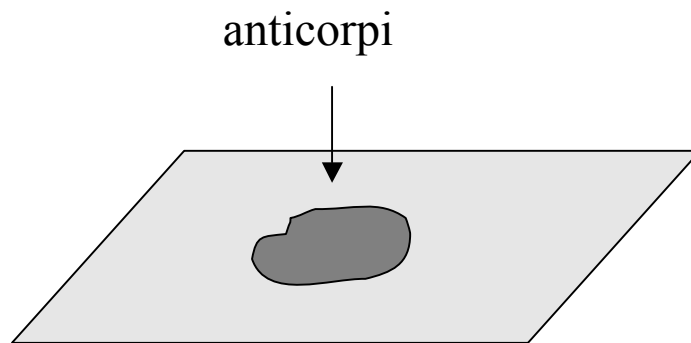


Vedi filmato

Tecniche immunologiche:

Interazioni anticorpo-antigene

Altre interazioni ?

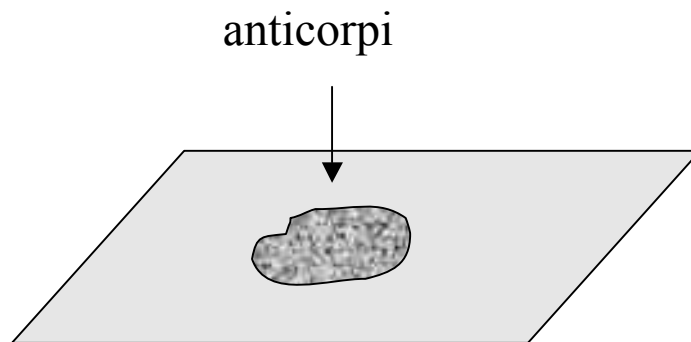


Risultato:

localizzazione di proteine

Tecniche immunologiche:

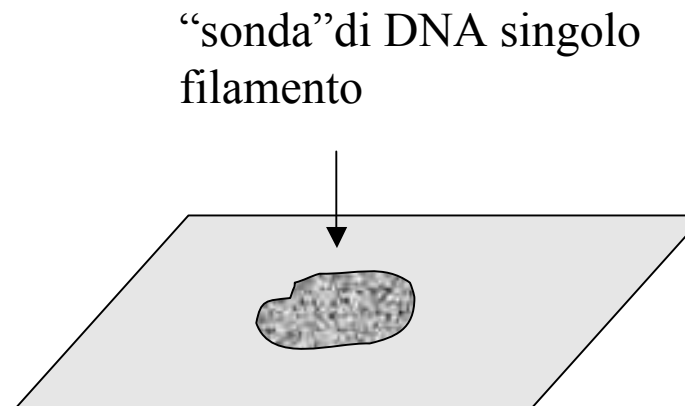
Interazioni anticorpo-antigene



Risultato:
localizzazione di proteine

Tecniche ibridazione in situ

Interazioni ac nucleici-ac. nucleici



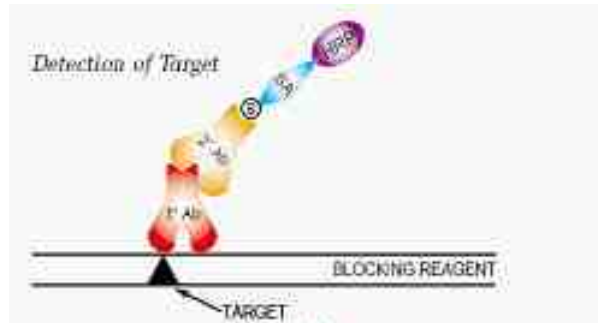
Risultato:
localizzazione di RNAm oppure
di sequenze di DNA

Immunohistochemistry

Antibody
(protein)



Antigen
(protein)



Hybridazione *in situ*

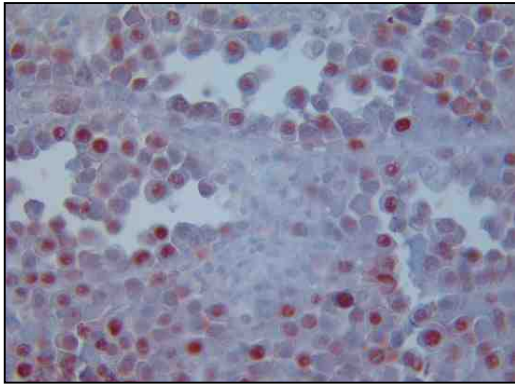
RNA probe
(nucleic acid)



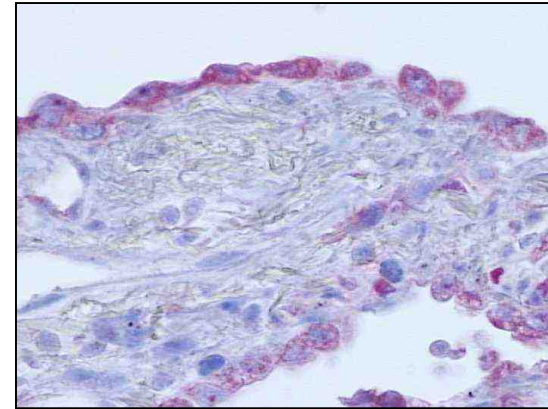
mRNA
(nucleic acid)



Ibridazione in situ



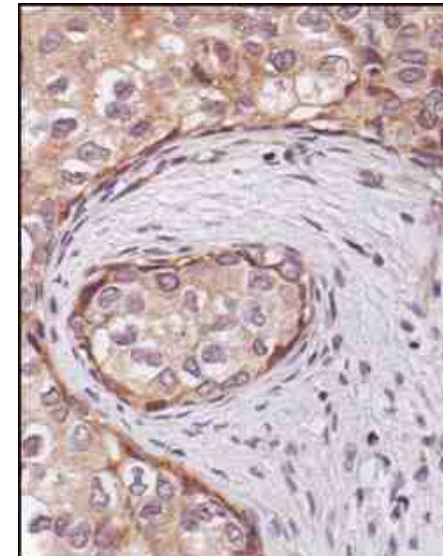
Ibridazione in situ per RNA del virus Epstein-Barr (EBER) in un linfoma plasmablastic di un paziente positivo al. Marcatura marrone dei nuclei delle cellule infette EBER.



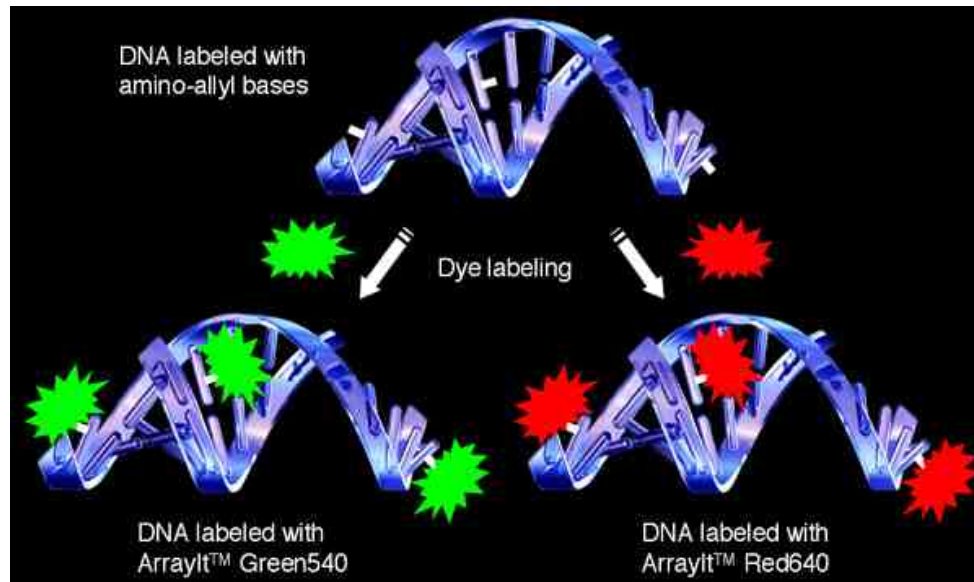
Ibridazione in situ per mRNA di SP-A su sezione di adenoma polmonre

Immunistochimica

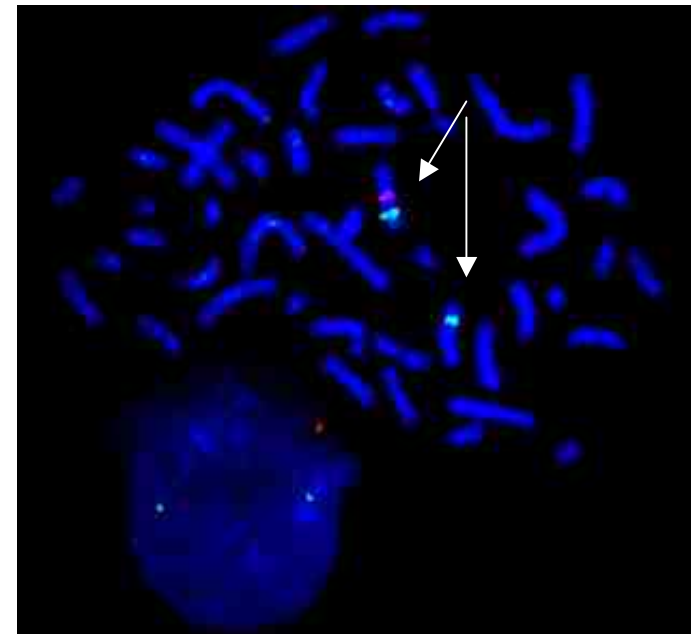
Sezioni di carcinoma mammario marcate con anticorpo AKT2



FISH (fluorescence in situ hybridization): tecnica utilizzata in citogenetica



Ibridazione della sonda su 2 cromosomi metafasici omologhi



Esempio di tecniche biochimiche- molecolari comunemente utilizzate da chi studia la biologia delle cellule e dei tessuti



Specificità di riconoscimento

Extrazione

Specificità di riconoscimento

Western blotting
proteine

proteine

Antigene-anticorpo

Northern blotting
mRNA

mRNA

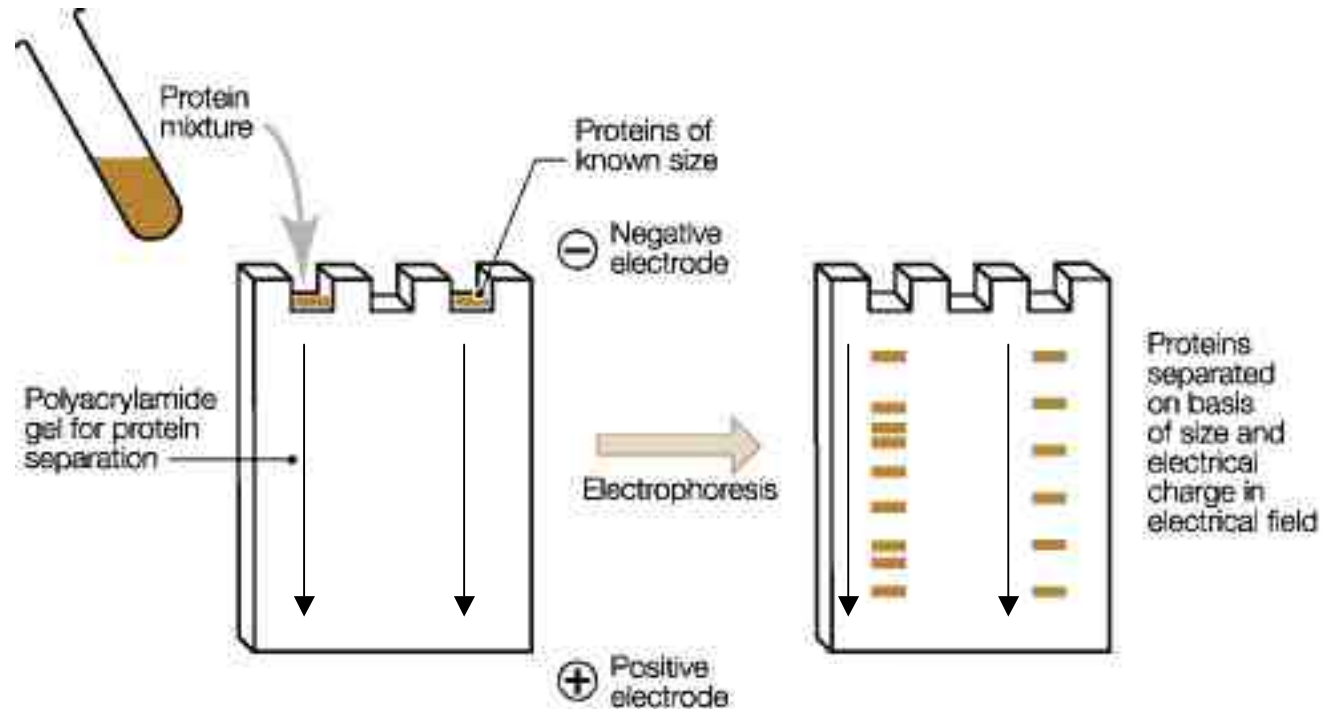
Ibridazione di acidi nucleici

Southern blotting
DNA

DNA

Ibridazione di acidi nucleici

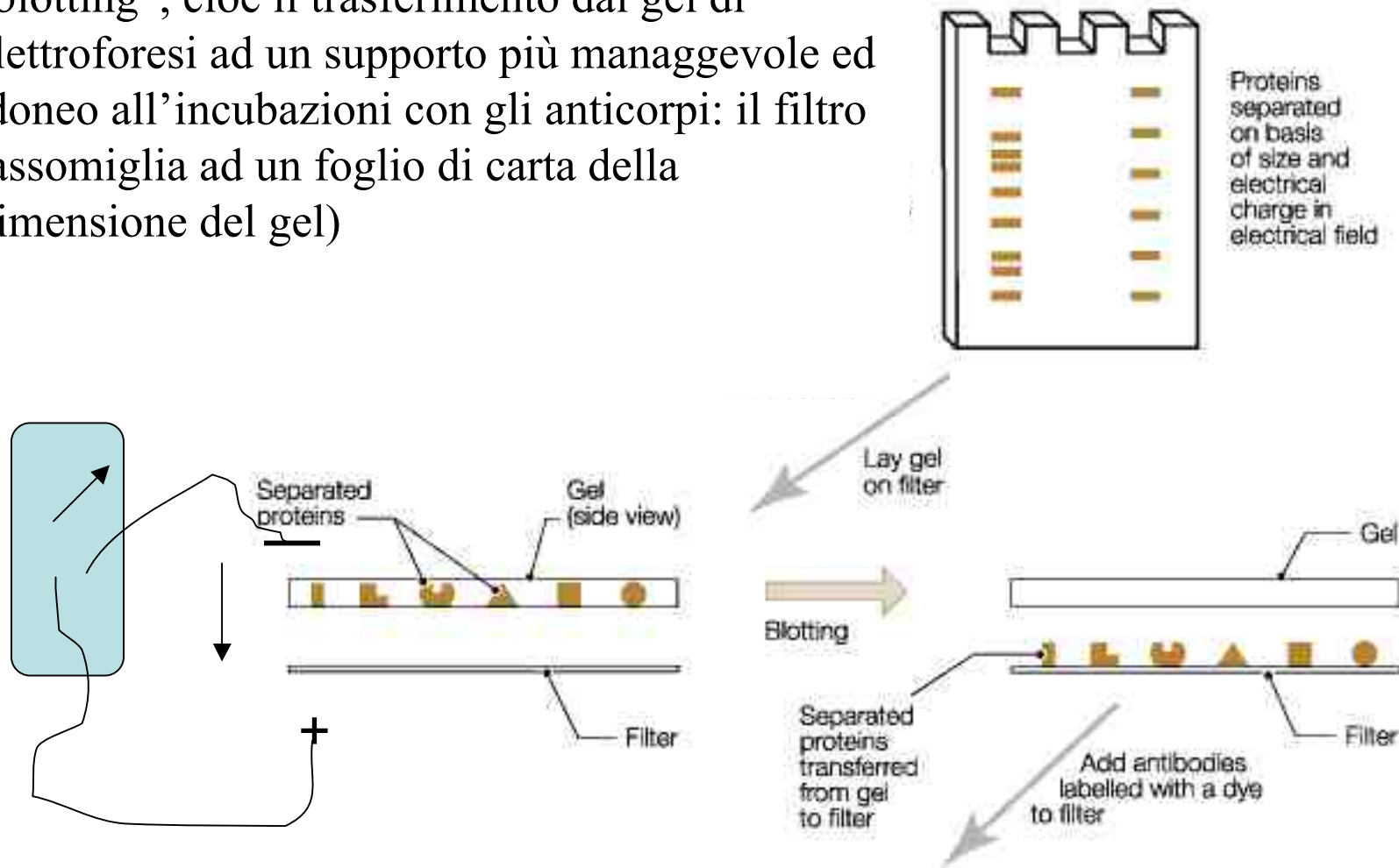
1. Estrazione delle proteine
2. Separazione delle proteine mediante corsa elettroforetica su gel



Le proteine dell'estratto, tutte caricate negativamente durante l'estrazione, sono depositate nel pozzetto. Dopo applicazione della corrente elettrica migrano dunque verso il polo positivo. La separazione avviene in funzione del peso molecolare di ciascuna proteina. Quelle più piccole, di più basso peso molecolare, migrano più rapidamente all'interno delle "maglie" del gel verso il polo positivo.

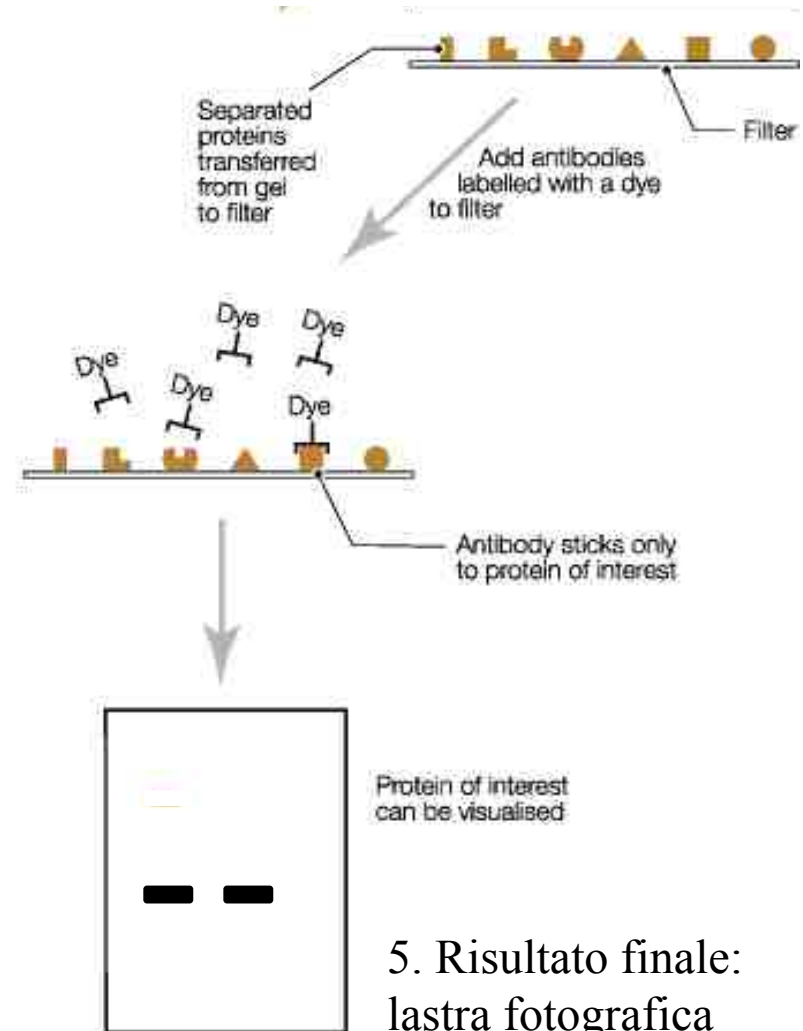
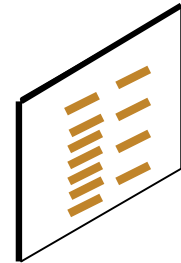
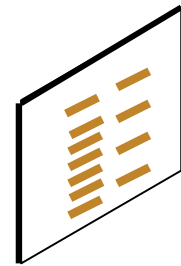
3. Trasferimento delle proteine dal gel di elettroforesi al filtro: “Blot”

Al termine dell'elettroforesi, si procede con il “blotting”, cioè il trasferimento dal gel di elettroforesi ad un supporto più maneggevole ed idoneo all'incubazioni con gli anticorpi: il filtro (assomiglia ad un foglio di carta della dimensione del gel)



4. Incubazione del filtro con anticorpi e rivelazione

Il filtro è poi incubato in presenza dell'anticorpo primario, lavato, incubato in presenza di anticorpo secondario coniugato ad un enzima che permette una reazione luminescente. La rivelazione avviene ponendo una lastra fotografica sul filtro, la luminescenza impressiona la lastra. Dopo sviluppo fotografico della lastra, le "macchie" nere corrispondono alla presenza della proteina d'interesse (antigene).



5. Risultato finale:
lastra fotografica
"impressionata"

